

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/58446 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/40,
31/54, 31/205, 31/195, 39/395

[DE/DE]; Sperberweg 27, 48308 Senden (DE). KAUF-MANN, Michael [DE/DE]; Auf der Heide 108, 58313 Herdecke (DE). SCHWARZ, Thomas [DE/DE]; Ginsterweg 6, 42799 Leichlingen (DE). VANGALA, Maya-Devi [DE/DE]; Bruchstr. 20 b, 58239 Schwerte (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/01611

(22) Internationales Anmelddatum:
14. Februar 2001 (14.02.2001)

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

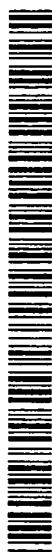
(30) Angaben zur Priorität:
00102972.7 14. Februar 2000 (14.02.2000) EP

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BITOP GMBH [DE/DE]; Stockumer Str. 28, 58453 Witten (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GALINSKI, Erwin



WO 01/58446 A1

(54) Title: USE OF COMPATIBLE SOLUTES AS INHIBITORS OF THE ENZYMATIC DECOMPOSITION OF MACRO-MOLECULAR BIOPOLYMERS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON KOMPATIBLEN SOLUTEN ALS INHIBITOREN DES ENZYMATISCHEN ABBAUS VON MAKROMOLEKULAREN BIOPOLYMEREN

(57) Abstract: The invention relates to the use of compatible solutes for protecting biopolymers against decomposition caused by degrading enzymes.

(57) Zusammenfassung: Verwendung von kompatiblen Soluten zum Schutz von Biopolymeren vor Abbau mit degradierenden Enzymen.

Verwendung von kompatiblen Soluten als Inhibitoren des enzymatischen
Abbaus von makromolekularen Biopolymeren

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von kompatiblen Soluten als Inhibitoren des enzymatischen Abbaus von makromolekularen Biopolymeren.

Die DE-A-198 34 816 betrifft die Verwendung von Ectoin oder Ecotoin-Derivaten in kosmetischen Formulierungen. Es wird offenbart, dass die genannten Verbindungen Nukleinsäuren der menschlichen Hautzellen schützen und stabilisieren vor physikalischen, chemischen und biologischen Einflüssen wie z. B. vor Strahlung, insbesondere UV-Strahlung, vor denaturierenden Substanzen, vor Enzymen, insbesondere Endonukleasen und Restriktionsenzymen und vor Viren, insbesondere Herpes-Viren.

Die US-A-5,039,704 offenbart ein Verfahren zur Behandlung einer katabolischen Dysfunktion in einem Lebewesen, wobei eine therapeutisch wirksame Menge von Glutaminen oder einem Analogon des Glutamins verabreicht wird.

US-A-5,684,045 betrifft die Behandlung eines katabolischen mit dem Verdauungstrakt assoziierten pathologischen Prozesses, insbesondere der Darmschleimhaut und pankreatischen Atrophie, erhöhter Darmpermeabilität und anderer Erkrankungen. Diese Erkrankungen werden mit einer therapeutisch wirksamen Menge des Glutamins oder eines Analogon davon behandelt.

US-A-5,428,063 betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung in Nahrungsergänzungsmitteln zur Behandlung oder Verhinderung von Lebererkrankungen. Dabei werden hohe Dosen an Betain verabreicht.

- 2 -

US-A-5,827,874 betrifft die Verwendung von Prolin zur Behandlung von Entzündungen und Schmerz, insbesondere zur Behandlung von entzündlichen Zuständen, rheumatischen und nicht rheumatischen Schmerzen und für postoperative und posttraumatische Schmerzen.

Knapp, S. et al. in Extremophiles, (1999), 3(3) 191-8, einen temperaturstabilisierenden Effekt kompatibler Solute. Genannt werden Ectoin, Hydroxyectoin und Betain.

Sauer, Th. et al. Biotechnology and Bioengineering (1998), 57 (3), 306 - 13 offenbart einen temperaturstabilisierenden Effekt der kompatiblen Solute Ectoin, Hydroxyectoin und Betain.

EP-A-0 915 167 betrifft ein Verfahren zur in-vivo-Gewinnung von Inhaltsstoffen aus Zellen durch Wechselbedingungen, denen die Zellen ausgesetzt werden. Ectoin und Hydroxyectoin wird als wirksamer Zusatz zur Kryoprotektion biologischer Wirkstoffe beschrieben.

Unerwünschter Abbau von makromolekularen Biopolymeren wird durch die spezifische Hemmung der die Reaktion katalysierenden Enzyme verhindert.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass der enzymatische Abbau von makromolekularen Biopolymeren auch durch Zugabe von kompatiblen Soluten unterdrückt werden kann, ohne dass es einer spezifischen Hemmung der den Abbau katalysierenden Enzyme bedarf.

Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung kompatibler Solute als Inhibitoren des enzymatischen Abbaus von makromolekularen Biopolymeren.

Enzymatischer Abbau biologischer Makromoleküle

Biologische Makromoleküle werden in anabolischen und katabolischen Stoffwechselprozessen auf- und abgebaut. Die enzymatische Aufspaltung organischer Makromoleküle in deren Monomerverbindungen kann durch Hydrolyse oder durch Phosphorolyse geschehen. Die Spaltung erfolgt bei der Hydrolyse unter Verbrauch von Wasser, bei der Phosphorolyse unter Verbrauch von Phosphat.

Die natürlichen Katalysatoren der Hydrolyse sind Hydrolasen. Zu den Hydrolasen zählen Lipasen, welche Fette zu Glycerin und Fettsäuren spalten, Phospholipasen, welche als Verdauungsenzyme Esterbindungen von Phosphatidylverbindungen spalten, Nukleasen, welche Nukleinsäurepolymere wie DNA und RNA spalten, Glykosidasen, welche Glycoside spalten, und Proteasen, welche die Peptidbindungen von Proteinen spalten.

Während der Proteolyse - also der Hydrolyse von Proteinen - werden die Peptidbindungen (auch Amidbindungen genannt) zwischen der α -Aminogruppe einer Aminosäure und der α -Carboxylgruppe einer zweiten Aminosäure unter Verbrauch eines Wassermoleküls gespalten. Im Falle der Spaltung eines Dipeptids - eines Peptids bestehend aus zwei Aminosäuren - werden durch Proteolyse zwei freie Aminosäuren gebildet.

Die bislang bekannten Proteasen ordnet man entsprechend ihrer Funktionsweise und ihren Substraten verschiedenen Proteaseklassen bzw. -familien zu. Folgende Proteaseklassen sind beschrieben:

- 4 -

Proteaseklasse bzw. -familie	Typische Protease	Charakteristische Aminosäuregruppe des aktiven Zentrums
Serin-Protease 1	Chymotrypsin A, Trypsin, Elastase, Thrombin	Katalytische Triade Aspartat, Serin, Histidin
Serin-Protease 2	Subtilisin	Katalytische Triade Aspartat, Serin, Histidin
Cystein-Protease	Papain, Cathepsin B	Cystein, Histidin, Aspartat
Aspartat-Protease	Penicillopepsin, Renin, Pepsin, Plasmin	Aspartat
Metallo-Protease 1	Carboxypeptidase A, Kollagenase	Zink, Calcium, Mangan, Glutamat, Tryptophan
Metallo-Protease 2	Thermolysin	Zink, Glutamat, Histidin

Tabelle 1: Bekannte Proteaseklassen und typische Vertreter

Proteolysen können partiell (limitiert) oder vollständig (total) ablaufen. Bei der partiellen Proteolyse entstehen unterschiedlich große Proteinfragmente bzw. Peptide, bei der totalen Hydrolyse wird ein Protein vollständig zu Aminosäuren abgebaut. Die Proteinketten werden hier strukturspezifisch oder -unspezifisch vom Ende der Proteinstränge durch sogenannte Exoproteinasen oder nach einer Spaltung mitten im Proteinstrang durch sogenannte Endoproteinasen abgebaut.

Technische Anwendungen der enzymkatalysierten Hydrolyse

Die enzymkatalysierte Hydrolyse wird auf vielen technischen Gebieten angewendet, wobei in der Biotechnik insbesondere die Proteolyse eine große Bedeutung besitzt. Spezifische Proteasen werden beispielsweise als

- 5 -

biochemische Werkzeuge zur Aufklärung von Struktur-/Funktions-beziehungen von Proteinen eingesetzt. Hierzu werden Proteine einer partiellen (limitierten) Proteolyse unterzogen und es wird geprüft, welche Eigenschaften die verbleibenden Proteinbruchstücke bzw. Peptide besitzen. Proteaseinhibitoren werden hier gezielt zum Abbruch ablaufender Proteolysen eingesetzt.

Die Proteolyse wird des weiteren zur Proteinsequenzanalyse und zur Peptidkartierung eingesetzt. Ebenfalls werden Proteasen zur Analyse der Topologie von Protein enthaltenden, biologischen Membranen und zur Solubilisierung von Membranproteinen verwendet.

Proteasen werden auch großtechnisch zur katalytischen Prozessierung von Proteinen und Peptiden eingesetzt. So werden Proteasen in Waschmitteln zur Entfernung von Proteinverunreinigungen in Textilien oder zur Reinigung technischer Oberflächen von Proteinverschmutzungen verwendet. Außerdem werden Proteasen zur industriellen Herstellung von Peptiden oder Aminosäuren aus Proteinen genutzt.

Schutz vor enzymatischem Abbau

Biologische Makromoleküle und Polymere können vor einem enzymatischen Abbau geschützt werden.

So kann beispielsweise die Proteolyse durch die Protease hemmende, sogenannte Proteaseinhibitoren teilweise oder vollständig verhindert werden. Proteaseinhibitoren werden in zwei Klassen unterteilt:

- Niedermolekulare, spezifisch am aktiven Zentrum einer Protease bindende Hemmstoffe, welche irreversibel die Aminosäurereste im aktiven Zentrum der Proteasen derart modifizieren, dass diese ihre Funktionalität verlieren.

- 6 -

- Proteaseinhibitoren, welche als sogenannte Pseudosubstrate für Proteasen dienen. Proteasen werden sozusagen von ihrem eigentlichen Proteinsubstrat ablenkt und der Reaktionslösung stöchiometrisch entzogen. Die Proteasen werden hier zwar nicht zerstört, aber spezifisch entfernt. Klasse 2 Proteaseinhibitoren sind ebenfalls solche, welche den Enzymen für ihre Aktivität essentielle Cofaktoren entziehen.

Zur erstgenannten Gruppe zählen z.B. die Serin-Protease-Inhibitoren Diisopropyl Phosphofluoridate (DFP) und Phenylmethansulfonyl Fluoride (PMSF). Aspartat Proteasen werden durch Diazoacetyl Verbindungen und durch Pepstatin inaktiviert. Metallo-Proteasen werden generell durch metall-chelatisierende Reagenzien inhibiert. Carboxypeptidase A und B werden spezifisch durch aus Kartoffeln isolierbare Hemmstoffe und Thermolysin durch Phosphoramidon gehemmt.

Zur zweiten Gruppe der Proteaseinhibitoren zählen z.B. Pankreas Trypsin Inhibitor, Sojabohne Trypsin Inhibitor, α -Proteaseinhibitor und der universelle Proteaseinhibitor α -2-Makroglobulin.

G. Salvesen und H. Nagase (1989) geben einen Überblick über die nach dem Stand der Technik genutzten Klasse 1 und Klasse 2 Inhibitoren [Inhibition of proteolytic enzymes. in Proteolytic enzymes: A practical approach (Herausgeber; R.J. Beynon und J.S. Bond, IRL Press Oxford)].

Klasse 1 Proteaseinhibitoren haben aufgrund ihres Wirkprinzips alle den Nachteil, dass sie grundsätzlich mit allen Proteinen und nicht nur mit Proteasen bzw. deren aktiven Zentren reagieren können. Klasse 1 Proteaseinhibitoren besitzen somit für biologische Systeme und Organismen ein toxisches Potential. Klasse 2 Proteaseinhibitoren weisen u.a. den Nachteil auf, dass sie die Proteasen nur stöchiometrisch und reversibel hemmen. Eine Proteolyse bleibt prinzipiell immer möglich.

Den bis hierher beschriebenen Verfahren zum Schutz vor enzymatischem Abbau ist gemein, dass der jeweils dafür verantwortliche Biokatalysator spezifisch gehemmt wird.

Die Proteolyse von Proteinen kann auch durch Proteindenaturierung verhindert werden. Hierbei wird die Sekundär-, Tertiär- sowie Quartär-Struktur aller Proteine vollständig zerstört, so dass spezifische Proteasen keine Aktivität mehr aufweisen. Derartige Denaturierungen werden durch chaotrope Reagenzien, wie z.B. Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid, bzw. durch Detergenzien, wie Natrium-dodecylsulfat, erreicht. Besonders nachteilig bei diesen Verfahren ist, dass eine Proteolyse zwar verhindert wird, aber die zu schützenden Proteine in den meisten Fällen ihre Funktion einbüßen.

Keine der hier aufgeführten Methoden zielt auf die Stabilisierung der jeweiligen Substrate ab.

Beschreibung der Erfindung

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass die Verwendung von kompatiblen Soluten den Abbau von makromolekularen Biopolymeren, insbesondere von Makromolekülen, Proteinen, Lipiden oder Nucleinsäuren, mit degradierenden Enzymen verhindert.

Vorzugsweise werden erfindungsgemäß als kompatible Solute Substanzen gewählt aus der Gruppe bestehend aus Ectoin, Derivaten des Ectoins wie Hydroxyectoin, Prolin, Betain, Glutamin, cyclisches Diphosphoglycerat, Mannosylglycerat, Derivaten des Mannosylglycerats wie Mannosylglyceramid, Di-myo-Inositolphosphat, Diglycerolphosphat, N-Acetylornithin, Trimethylamine-N-oxid oder Kombinationen davon eingesetzt werden.

Die Verwendung der kompatiblen Solute in einer Konzentration von 0,05 bis 2,0 M ist bevorzugt. Weiter bevorzugt ist bei Verwendung von Ectoin eine

- 8 -

Konzentration von 0,1 - 1 M, insbesondere 0,1 - 0,5 M. Bei Verwendung anderer Solute sind 0,4 - 1,5 M, insbesondere 0,4 - 1,2 M bevorzugt.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zum Schutz von Biopolymeren vor dem Abbau durch degradierende Enzyme bereitgestellt, bei dem zu einer die Biopolymere enthaltenden Probe kompatible Solute zugefügt werden.

Gegebenenfalls erfolgt nach Zugabe des kompatiblen Solutes oder der kompatiblen Solute eine Inkubation, woraufhin sich gegebenenfalls Weiterverarbeitungsschritte, wie Zellaufschluss und Isolierung des abbaubaren Biopolymers anschließen.

Insbesondere ist die Probe ein biotechnischer Ansatz zur Herstellung von Proteinen oder Nucleinsäuren.

Die der Erfindung zugrunde liegenden Untersuchungen haben nun überraschend gezeigt, dass durch Einsatz kompatibler Solute der enzymatische Abbau verhindert werden kann, wobei erstaunlicherweise weder die Funktionalität des zu schützenden Biopolymers noch die des abbauenden Enzyms verloren gehen. Die Resultate zeigen außerdem, dass Makromoleküle vor einem enzymatischen Angriff geschützt werden können, während kleine Proteine und Peptide nicht geschützt werden.

Der Abbau scheint also bei Einwirkung kompatibler Solute nicht durch eine spezifische Inhibition oder Eliminierung der degradierenden Enzyme, sondern vielmehr über eine möglicherweise unspezifische Stabilisierung der makromolekularen Substrate selbst verhindert zu werden. Durch die Zugabe von kompatiblen Soluten wird das Biopolymer scheinbar in seiner Struktur so verändert, dass das abbauende Enzym das Biopolymer nicht mehr "erkennt". Enzymatischer Abbau von Biomolekülen wird somit wahrscheinlich durch sterische Enzym-Substrat-Inkompatibilität unspezifisch unterdrückt.

- 9 -

Die Anwendung der Erfindung hat insbesondere für Anwendungen bei Proteinen den immensen Vorteil, dass eine einzige Inhibitionslösung universell einsetzbar wird. Häufig enthalten Proteinlösungen ein größeres Spektrum an unerwünschten Proteasen, was nach dem Stand der Technik für jeden Proteasenotyp einen spezifischen Inhibitor erfordert und die Verwendung von Inhibitionsmixturen nach sich zieht. Dieses Vorgehen und die damit verbundenen Nachteile können durch das erfindungsgemäße Verfahren umgangen werden.

Im Zusammenhang mit den hier beschriebenen Wirkungen stehen auch Wirkungen der kompatible Solute als Arzneimittel. Erfindungsgemäß können die kompatiblen Solute zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden, die durch enzymatischen Abbau von Biopolymeren und von Biopolymeren gebildeten Strukturen, wie Zellen, Organellen oder Gewebe, verursacht werden und im kausalen Zusammenhang mit pathologischen Erscheinungen stehen. Dazu gehören insbesondere Erkrankungen, wie Erkrankungen des Immunsystems, wie Autoimmunerkrankungen, Insulin abhängige Diabetes melitus, Graves-Krankheit, Hashimotos-Krankheit, nachteilige Nebenwirkungen von Strahlungsbehandlungen, Entzündungsprozesse, Transplantatabstoßung, HIV-Infektionen bzw. retrovirale Infektionen (z.B. Herpes), Gewebeverletzung/Wundheilung, akute und chronische Entzündung, akute Pankreatitis, Schockzustände, fibrinolytische Blutung, Herzkrankheiten (z.B. Infarkt), Alzheimer's Krankheit, neuronale Degeneration, Krankheiten von Leber, Skelett und Muskel, Bluthochdruck, Metastasenbildung von Krebszellen und Hautkrebs.

Beispiele

Die Wirksamkeit des der Erfindung zugrunde liegenden Prinzips wurde durch Hemmung der limitierten Proteolyse von Antikörpern dokumentiert. Die Experimente wurden mit folgenden Antikörpern oder Konjugaten ausgeführt:

- 10 -

Humanes IgG: Sigma Product No. 14506 Lot 037H8816; Rinder IgG; Serva; Cohn-Faktion II Product No. 22550; Monoklonaler Maus Anti-Human IgG: DAKO Klon A57H Code No. Mo828 Lot 076 IgM kappa: Kaninchen Anti-Maus IgG + IgM (H+L): Dianova Code No. 315-035-058 Lot 39605.

Es wurden limitierte Proteolysen des humanen IgG bei einer Antikörperkonzentration von 0,5 mg/ml und einer Pepsinkonzentration von 5 µg/ml bei 37°C in 100 mM Natriumacetat pH 3 durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten ohne Zusätze unter 0,5 M Ectoin, unter 0,5 M Hydroxyectoin sowie unter einer Mischung aus 0,25 M Ectoin und 0,25 M Hydroxyectoin. Der Verlauf der limitierten Proteolysen wurde im Anschluss an die Inkubationen in 12%igen SDS-Gelen unter reduzierenden Bedingungen quantifiziert.

Aus Figur 1 ergibt sich, dass die Hydrolyse der schweren Kette sowohl durch Ectoin als auch durch Hydroxyectoin signifikant gehemmt wird.

Figur 1 zeigt die limitierte Proteolyse der schweren Ketten (s. K.) eines humanen Antikörpers (IgG) durch Pepsin. Bahnen 1, 5, 9: mit Wasser; Bahnen 2, 6, 10: mit Ectoin; Bahnen 3, 7, 11: mit Ectoin und Hydroxyectoin; Bahnen 4, 8, 12: mit Hydroxyectoin; Bahnen 1, 2, 3, 4: ohne Inkubation; Bahnen 5, 6, 7, 8; nach 15 min. Inkubation; Bahnen 9, 10, 11, 12; nach 180 min. Inkubation.

Die Hemmung der Proteolyse von Antikörpern durch Ectoin wurde zusätzlich mittels Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) gezeigt. Dazu wurden 96-Well-ELISA-Platten über Nacht mit 0,5 µg humanem IgG in 100 µl 0,9% NaCl bei 4°C beschichtet. Im Anschluß daran wurden die Platten 3 x in 50 mM Tris, 0,8% NaCl, 0,02% KCl, pH 74 C(T-TBS) gewaschen und mit 200 µl 1% Gelatine in TBS für 2 Stunden bei 37°C blockiert. Nach dreimaligem Waschen in T-TBS erfolgte eine Inkubation mit einem monoklonalen Maus-anti-Human-IgG 1 : 250 in TBS verdünnt mit 50 µl pro Well für eine Stunde bei 37°C. Nach viermaligem Waschen mit T-TBS erfolgte eine Inkubation mit einem

- 11 -

Peroxidase konjugierten Kaninchen anti-Maus-Antikörper 1 : 5000 in TBS verdünnt mit 100 µl pro Well für eine Stunde bei 37°C. Nach weiterem viermaligem Waschen erfolgte die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 µl pro Well Substrat. Als Substrat diente 4,8 mg Phenylendiamin in 3 ml 0,2 M Na₂HPO₄, 3 ml 0,1 M Citronensäure, 6 ml Wasser und 5 µl H₂O₂. Die Reaktion wurde nach ca. 10 Minuten durch Ansäuern mit 100 µl pro Well 0,07 M Schwefelsäure gestoppt und die Platten in einem ELISA-Autoreader quantifiziert. Alle drei Proteinkomponenten wurden vor dem Experiment für zwei Stunden bei 37°C mit bzw. ohne Zugabe von 0,5 M Ectoin durch Pepsin proteolysiert. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, konnten zwei Antikörper gegen den proteolytischen Verdau durch Zugabe von 0,5 M Ectoin wirkungsvoll geschützt werden. Das Antikörperkonjugat wurde nicht durch Pepsin angegriffen. Die Behandlung wurde in analoger Weise mit Hydroxyectoin, Prolin und Betain durchgeführt.

Vorbehandelter Antikörper			
	humaner IgG	monoklonaler Maus-Antikörper	Peroxidase Konjugat
ohne Behandlung	100%	100%	100%
mit Ectoin	85%	97%	98%
mit Pepsin	6%	59%	104%
mit Ectoin und Pepsin	91%	98%	121%

Tabelle 2: Restsignal im ELISA nach angegebener Vorbehandlung der einzelnen Antikörper

Die Konzentrationsabhängigkeit des Effektes vom kompatiblen Solut wurde am Beispiel von Ectoin, Hydroxyectoin, Prolin und Betain bestimmt. Hierbei wurde das humane Immunglobulin wie beschrieben proteolysiert und der Effekt im ELISA quantifiziert.

- 12 -

Figur 2 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Stabilisierung eines humanen Antikörpers gegen Proteolyse durch Pepsin in Gegenwart steigender Konzentration an Ectoin, Hydroxyectoin, Prolin, Betain. Die Figur 3 zeigt das Ergebnis der Kontrollversuche ohne Zugabe von Pepsin zum Gemisch aus Antikörper und kompatiblem Solut.

Die Experimente lassen prinzipiell zwei Erklärungsmöglichkeiten zu. Zum einen könnten die kompatiblen Solute die Protease inhibieren. Zum anderen könnten die Solute erfindungsgemäß über die Stabilisierung der nativen, kompakteren Konformation des Antikörpermoleküls den Angriff der Protease aus sterischen Gründen verhindern. Es wurde daher der Effekt von Ectoin und Hydroxyectoin auf die Aktivität von Pepsin anhand der Hydrolyse eines synthetischen, niedermolekularen Hexapeptids spektrophotometrisch bestimmt [Schinaith, E.: Clin. Biochem. 22, 91-98 (1989)]. Die enzymkinetischen Messungen mit Leu-Ser-p-NitroPhe-Nle-Ala-Leu-Methylester als Substrat zeigten, dass weder Ectoin noch Hydroxyectoin die Protease inhibieren. Dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass die Hemmung der Antikörperproteolysen erfindungsgemäß auf sterische Effekte zurückzuführen ist.

Patentansprüche

1. Verwendung von kompatiblen Soluten zum Schutz von Biopolymeren vor Abbau durch degradierende Enzyme.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Biopolymere Makromoleküle, Lipide, Proteine, Fette oder Nucleinsäuren sind.
3. Verwendung nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei die degradierenden Enzyme Hydrolasen, insbesondere Proteasen, oder Phosphorylasen sind.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei als kompatible Solute Substanzen gewählt aus der Gruppe bestehend aus Ectoin, Derivaten des Ectoins wie Hydroxyectoin, Prolin, Betain, Glutamin, cyclisches Diphosphoglycerat, Mannosylglycerat, Mannosylglyceramid, Di-myoinositol-1,1'-Phosphat, Diglycerolphosphat, N_γ-Acetylornithin, Trimethylamine-N-oxid oder Kombinationen davon eingesetzt werden.
5. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die kompatiblen Solute in einer Konzentration von 0,05 bis 2 M eingesetzt werden.
6. Verfahren zum Schutz von Biopolymeren vor Abbau durch degradierende Enzyme, wobei zu einer die Biopolymere enthaltenden Probe kompatible Solute zugefügt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei nach Zugabe des kompatiblen Soluts oder der kompatiblen Solute eine Inkubation erfolgt, woraufhin sich gegebenenfalls Weiterverarbeitungsschritte, wie Zellaufschluß und Isolierung des abbaubaren Biopolymers anschließen.

- 14 -

8. Verfahren nach Anspruch 6 und/oder 7, wobei die Probe ein biotechnologischer Ansatz zur Herstellung von Proteinen oder Nucleinsäuren ist.
9. Verwendung von kompatiblen Soluten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen, die durch den Abbau von Biopolymeren und von Biopolymeren gebildeten Strukturen, wie Zellen, Organellen oder Gewebe, durch degradierende Enzyme verursacht werden.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Erkrankungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Erkrankungen des Immunsystems, wie Autoimmunerkrankungen, Insulin abhängige Diabetes melitus, Graves-Krankheit, Hashimotos-Krankheit, nachteilige Nebenwirkungen von Strahlungsbehandlungen, Entzündungsprozesse, Transplantatabstoßung, HIV-Infektionen bzw. retrovirale Infektionen (z.B. Herpes), Gewebeverletzung/Wundheilung, akute und chronische Entzündung, akute Pankreatitis, Schockzustände, fibrinolytische Blutung, Herzkrankheiten (z.B. Infarkt), Alzheimer's Krankheit, neuronale Degeneration, Krankheiten von Leber, Skelett und Muskel, Bluthochdruck, Metastasenbildung von Krebszellen und Hautkrebs.

-1/3-

۱۰

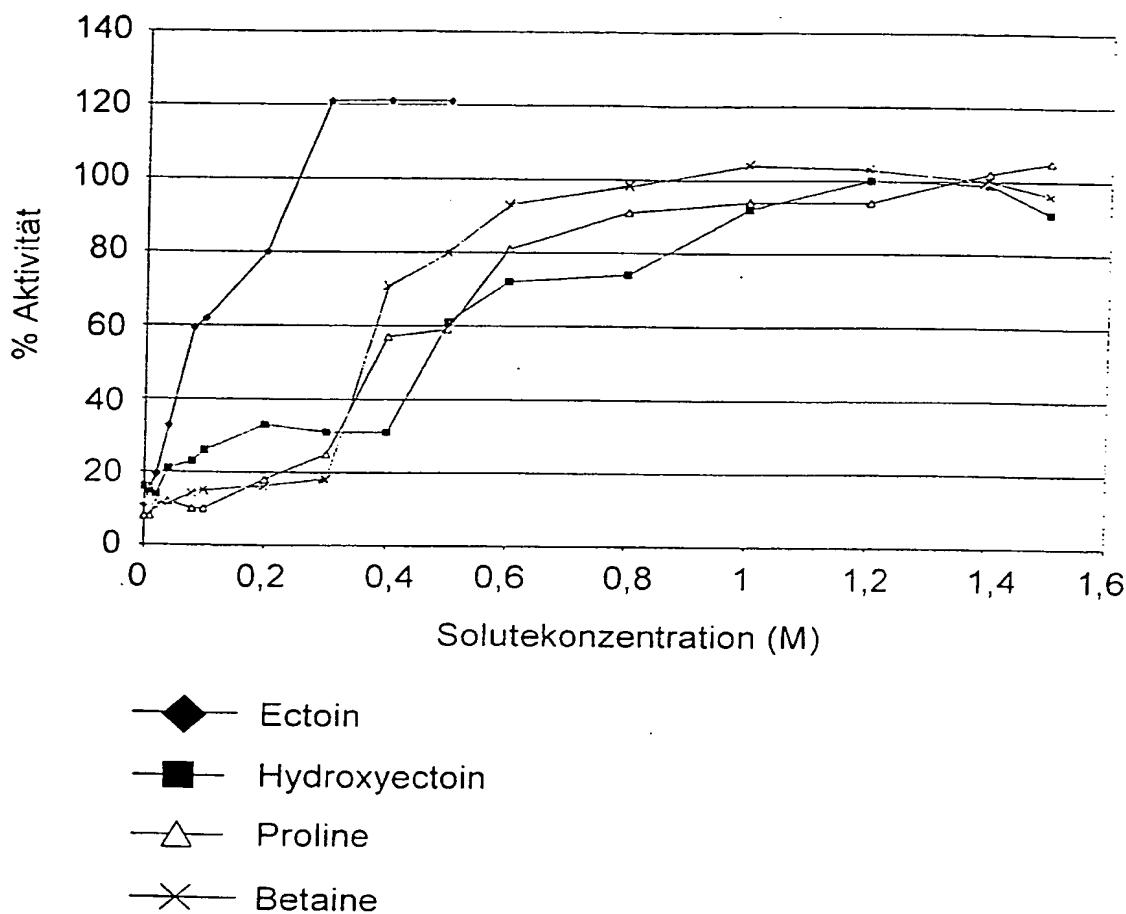
५

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

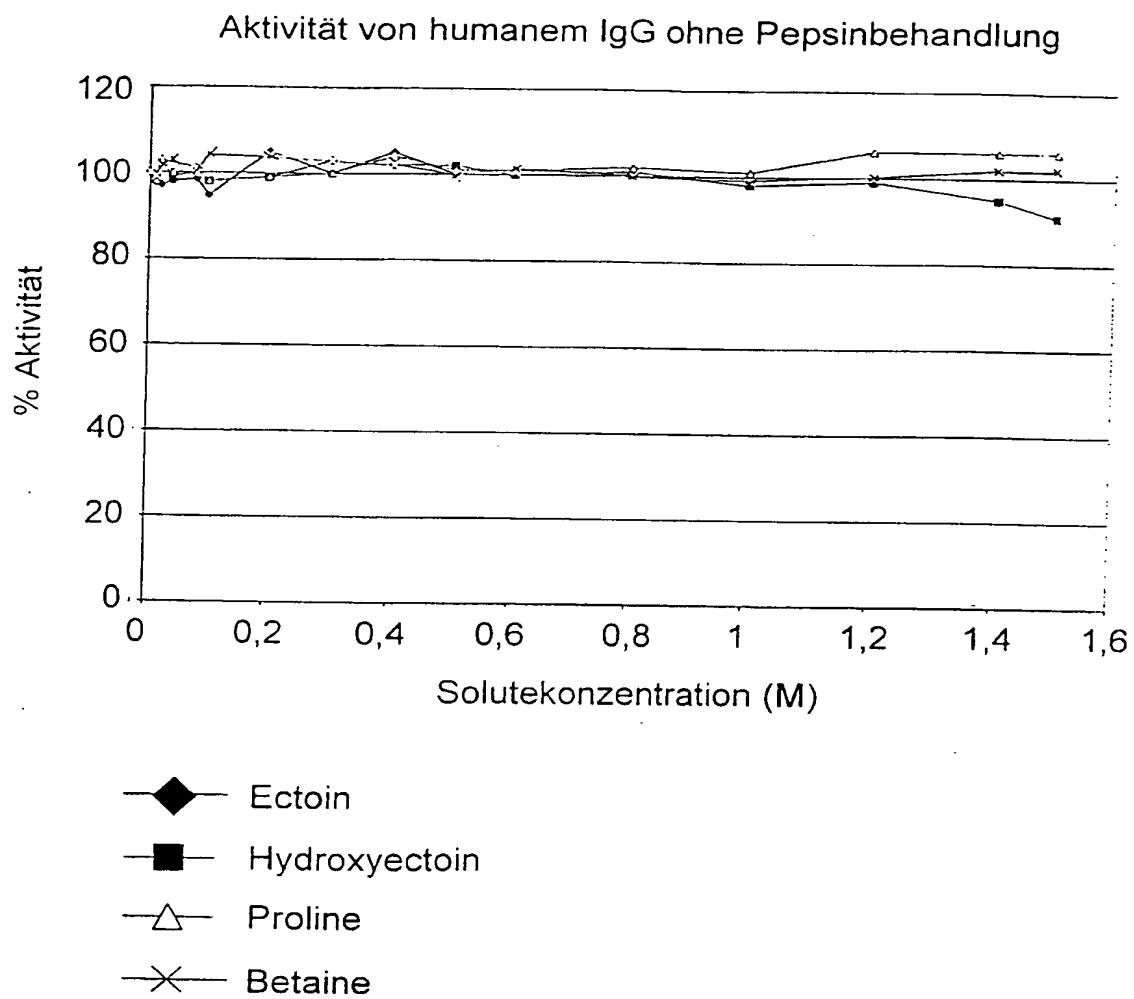
Fig. 1

- 2/3 -

Hemmung der Proteolyse von humanem IgG durch
Pepsin mit Hilfe von kompatiblen Soluten



Figur 2



Figur 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 01/01611

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/40 A61K31/54 A61K31/205 A61K31/195 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data, PAJ, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 198 34 816 A (MERCK PATENT GMBH) 3 February 2000 (2000-02-03) cited in the application page 2, line 38 - line 41 page 4, line 40 - line 50 claim 5 -----	1-5
Y	US 5 039 704 A (SMITH ROBERT J ET AL) 13 August 1991 (1991-08-13) cited in the application column 3, line 46 - line 54 claims 1,6,18 column 1, line 20 - line 34 -----	6-8
X	US 5 039 704 A (SMITH ROBERT J ET AL) 13 August 1991 (1991-08-13) cited in the application column 3, line 46 - line 54 claims 1,6,18 column 1, line 20 - line 34 -----	9,10
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 April 2001

Date of mailing of the international search report

11/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brunnauer, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/01611

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 684 045 A (SMITH ROBERT J ET AL) 4 November 1997 (1997-11-04) cited in the application column 5, line 58 - line 65 claim 1 ---	9,10
X	US 5 428 063 A (BARAK ANTHONY J ET AL) 27 June 1995 (1995-06-27) cited in the application column 1, line 65 -column 2, line 1 column 3, line 21 - line 47 ---	9,10
X	US 5 827 874 A (BERNHARD SEGESSER ET AL) 27 October 1998 (1998-10-27) cited in the application column 1, line 50 - line 57 ---	9,10
Y	KNAPP S ET AL: "Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta- hydroxyectoine and betaine." EXTREMOPHILES, (1999 AUG) 3 (3) 191-8., XP000917508 cited in the application page 191 ---	1-8
Y	SAUER T ET AL: "Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, (1998 FEB 5) 57 (3) 306-13., XP000919323 cited in the application page 306 ---	1-8
Y	EP 0 915 167 A (BITOP GMBH) 12 May 1999 (1999-05-12) cited in the application page 3, line 53 - line 56 page 4, line 1 - line 5 -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/01611

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19834816 A	03-02-2000	AU 5286599 A WO 0007558 A		28-02-2000 17-02-2000
US 5039704 A	13-08-1991	US 4857555 A US RE35233 E AT 152621 T AU 599335 B AU 6337886 A CA 1285491 A DE 3650620 D DE 3650620 T DK 241287 A EP 0238553 A JP 7094389 B JP 63501214 T NO 871935 A US 5397803 A WO 8701589 A US 5763485 A US 5684045 A US 5607975 A		15-08-1989 07-05-1996 15-05-1997 19-07-1990 07-04-1987 02-07-1991 12-06-1997 11-09-1997 10-07-1987 30-09-1987 11-10-1995 12-05-1988 09-07-1987 14-03-1995 26-03-1987 09-06-1998 04-11-1997 04-03-1997
US 5684045 A	04-11-1997	US 5763485 A US 5397803 A US 4857555 A US 5607975 A AT 160089 T AU 641403 B AU 5827190 A DE 69031694 D DE 69031694 T DK 401056 T EP 0401056 A ES 2111529 T GR 3025678 T HU 61193 A IL 94549 A JP 5500655 T JP 3068644 B JP 3113876 B JP 2000198733 A JP 3113877 B JP 2000186034 A JP 3113878 B JP 2000186035 A KR 178799 B PT 94223 A, B WO 9014823 A ZA 9004151 A US RE35233 E US 5039704 A AT 152621 T AU 599335 B AU 6337886 A CA 1285491 A DE 3650620 D DE 3650620 T DK 241287 A		09-06-1998 14-03-1995 15-08-1989 04-03-1997 15-11-1997 23-09-1993 07-01-1991 18-12-1997 12-03-1998 27-07-1998 05-12-1990 16-03-1998 31-03-1998 28-12-1992 04-08-1996 12-02-1993 24-07-2000 04-12-2000 18-07-2000 04-12-2000 04-07-2000 04-12-2000 04-07-2000 20-03-1999 08-02-1991 13-12-1990 27-03-1991 07-05-1996 13-08-1991 15-05-1997 19-07-1990 07-04-1987 02-07-1991 12-06-1997 11-09-1997 10-07-1987

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/01611

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5684045 A		EP 0238553 A		30-09-1987
		JP 7094389 B		11-10-1995
		JP 63501214 T		12-05-1988
		NO 871935 A		09-07-1987
		WO 8701589 A		26-03-1987
US 5428063 A	27-06-1995	NONE		
US 5827874 A	27-10-1998	CA 2175429 A		06-11-1996
		EP 0740938 A		06-11-1996
		JP 8337526 A		24-12-1996
EP 0915167 A	12-05-1999	DE 4244580 A		07-07-1994
		AT 172750 T		15-11-1998
		DE 59309101 D		03-12-1998
		DK 677044 T		12-07-1999
		WO 9415923 A		21-07-1994
		EP 0677044 A		18-10-1995
		EP 0887418 A		30-12-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01611

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES					
IPK 7	A61K31/40	A61K31/54	A61K31/205	A61K31/195	A61K39/395

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data, PAJ, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 198 34 816 A (MERCK PATENT GMBH) 3. Februar 2000 (2000-02-03) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 38 - Zeile 41 Seite 4, Zeile 40 - Zeile 50 Anspruch 5 ---	1-5
Y		6-8
X	US 5 039 704 A (SMITH ROBERT J ET AL) 13. August 1991 (1991-08-13) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3, Zeile 46 - Zeile 54 Ansprüche 1,6,18 Spalte 1, Zeile 20 - Zeile 34 ---	9,10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *g* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
18. April 2001	11/05/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Brunnauer, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01611

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 684 045 A (SMITH ROBERT J ET AL) 4. November 1997 (1997-11-04) in der Anmeldung erwähnt Spalte 5, Zeile 58 – Zeile 65 Anspruch 1 ---	9,10
X	US 5 428 063 A (BARAK ANTHONY J ET AL) 27. Juni 1995 (1995-06-27) in der Anmeldung erwähnt Spalte 1, Zeile 65 – Spalte 2, Zeile 1 Spalte 3, Zeile 21 – Zeile 47 ---	9,10
X	US 5 827 874 A (BERNHARD SEGESSER ET AL) 27. Oktober 1998 (1998-10-27) in der Anmeldung erwähnt Spalte 1, Zeile 50 – Zeile 57 ---	9,10
Y	KNAPP S ET AL: "Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta- hydroxyectoine and betaine." EXTREMOPHILES, (1999 AUG) 3 (3) 191-8., XP000917508 in der Anmeldung erwähnt Seite 191 ---	1-8
Y	SAUER T ET AL: "Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, (1998 FEB 5) 57 (3) 306-13., XP000919323 in der Anmeldung erwähnt Seite 306 ---	1-8
Y	EP 0 915 167 A (BITOP GMBH) 12. Mai 1999 (1999-05-12) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 53 – Zeile 56 Seite 4, Zeile 1 – Zeile 5 -----	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Ver. „lichungen, die zur selben Patentfamilie gehören“

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01611

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19834816 A	03-02-2000	AU 5286599 A WO 0007558 A	28-02-2000 17-02-2000
US 5039704 A	13-08-1991	US 4857555 A US RE35233 E AT 152621 T AU 599335 B AU 6337886 A CA 1285491 A DE 3650620 D DE 3650620 T DK 241287 A EP 0238553 A JP 7094389 B JP 63501214 T NO 871935 A US 5397803 A WO 8701589 A US 5763485 A US 5684045 A US 5607975 A	15-08-1989 07-05-1996 15-05-1997 19-07-1990 07-04-1987 02-07-1991 12-06-1997 11-09-1997 10-07-1987 30-09-1987 11-10-1995 12-05-1988 09-07-1987 14-03-1995 26-03-1987 09-06-1998 04-11-1997 04-03-1997
US 5684045 A	04-11-1997	US 5763485 A US 5397803 A US 4857555 A US 5607975 A AT 160089 T AU 641403 B AU 5827190 A DE 69031694 D DE 69031694 T DK 401056 T EP 0401056 A ES 2111529 T GR 3025678 T HU 61193 A IL 94549 A JP 5500655 T JP 3068644 B JP 3113876 B JP 2000198733 A JP 3113877 B JP 2000186034 A JP 3113878 B JP 2000186035 A KR 178799 B PT 94223 A,B WO 9014823 A ZA 9004151 A US RE35233 E US 5039704 A AT 152621 T AU 599335 B AU 6337886 A CA 1285491 A DE 3650620 D DE 3650620 T DK 241287 A	09-06-1998 14-03-1995 15-08-1989 04-03-1997 15-11-1997 23-09-1993 07-01-1991 18-12-1997 12-03-1998 27-07-1998 05-12-1990 16-03-1998 31-03-1998 28-12-1992 04-08-1996 12-02-1993 24-07-2000 04-12-2000 18-07-2000 04-12-2000 04-07-2000 04-12-2000 04-07-2000 20-03-1999 08-02-1991 13-12-1990 27-03-1991 07-05-1996 13-08-1991 15-05-1997 19-07-1990 07-04-1987 02-07-1991 12-06-1997 11-09-1997 10-07-1987

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01611

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5684045 A		EP 0238553 A		30-09-1987
		JP 7094389 B		11-10-1995
		JP 63501214 T		12-05-1988
		NO 871935 A		09-07-1987
		WO 8701589 A		26-03-1987
US 5428063 A	27-06-1995	KEINE		
US 5827874 A	27-10-1998	CA 2175429 A		06-11-1996
		EP 0740938 A		06-11-1996
		JP 8337526 A		24-12-1996
EP 0915167 A	12-05-1999	DE 4244580 A		07-07-1994
		AT 172750 T		15-11-1998
		DE 59309101 D		03-12-1998
		DK 677044 T		12-07-1999
		WO 9415923 A		21-07-1994
		EP 0677044 A		18-10-1995
		EP 0887418 A		30-12-1998